

Pseudomonas chlororaphisはGacS依存的に抗菌活性を示す

著者	山岸 滉
出版者	法政大学大学院理工学・工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	62
ページ	1-2
発行年	2021-03-24
URL	http://doi.org/10.15002/00024030

Pseudomonas chlororaphis は GacS 依存的に抗菌活性を示す

ANTIFUNGAL ACTIVITY EXHIBITED BY PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS
IS DEPENDENT ON GACS

山岸 滉

Hiroshi YAMAGISHI

指導教員 大島 研郎

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Pseudomonas chlororaphis is one of the soil-inhabitating gram-negative bacteria. They produce second metabolites with antifungal activity, of which mechanisms about the gene regulation remain unclear. In this study, to investigate molecular mechanisms of the antifungal activity, we conducted random transposon mutagenesis to *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 13985, and screened mutant strains with difference in antifungal-activity. By identification of the position of transposon insertion, we found *gacS* and *rsmY* gene may positively regulate the antifungal activity. In addition, we found a novel protein positively regulating antifungal activity although its function was unknown.

Key Words : *Pseudomonas chlororaphis*, antifungal activity, *gacS*, *rsmY*

1. 緒言

Pseudomonas chlororaphis (以下 *Psc*) は土壌生息性の細菌であり、植物病原性真菌による病害を軽減する働きを持つことが知られている。ピロールニトリンやフェナジン色素などの二次代謝産物を用いてこのような働きを示すとされているが、そのシグナル伝達機構や二次代謝産物の生合成メカニズムの詳細は未知である。本研究では、*phz0* 遺伝子を含むフェナジン生合成遺伝子群を持ち赤色色素 20H-フェナジンを生合成する *Psc* subsp. *aureofaciens* 13985 (以下 *Psc* 13985) 用い、*Psc* のシグナル伝達機構や二次代謝産物の生合成メカニズムの関連性を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

(1) 遺伝子破壊株の作出

Psc 13985 コンピテントセルを作製し、EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit を用いてエレクトロポレーション法によるトランスポゾン挿入を行った。エレクトロポレーション後にカナマイシン含有培地においてトランスポゾンが挿入されている株を選抜し、遺伝子破壊株とした。

(2) 対峙培養による抗菌活性測定

PDA 平板培地において 5 日培養した白絹病菌 *Sclerotium rolfsii* と平板培地において 1 日培養した

Psc 13985 を平板培地上に同時に移植し、25℃のインキュベータにおいて 7 日培養した。7 日経過後に形成された阻止円の半径を測定し、抗菌活性の強さを評価した。

(3) トランスポゾン挿入位置の特定

作出した遺伝子破壊株の DNA を抽出し、Universal Genome Walker Kit を用いることでトランスポゾン挿入位置付近の塩基配列を取得した。得られた塩基配列を query として BLAST 検索し、トランスポゾン挿入位置を特定した。

3. 結果及び考察

遺伝子破壊株を作出し、抗菌活性を測定したところ、抗菌活性が顕著に低下し赤色色素を産生しなくなった遺伝子破壊株が 3 株得られた(図. 1, 図 2)。これらの遺伝子破壊株のトランスポゾン挿入位置を特定したところ、*gacS*, *rsmY*, hypothetical protein の付近に挿入が確認された(図. 3)。*gacS* は細菌の Two-Component System (以下 TCS) におけるセンサーキナーゼを、*rsmY* は GacS の下流で情報伝達因子として働くタンパク質結合性 RNA を、hypothetical protein は機能未知タンパク質をそれぞれコードしている。

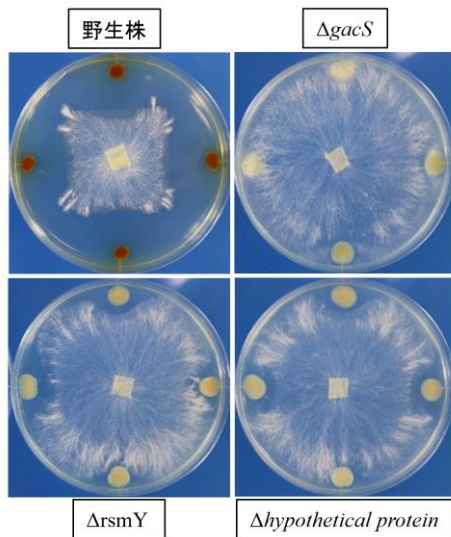


図.1 対峙培養の様子

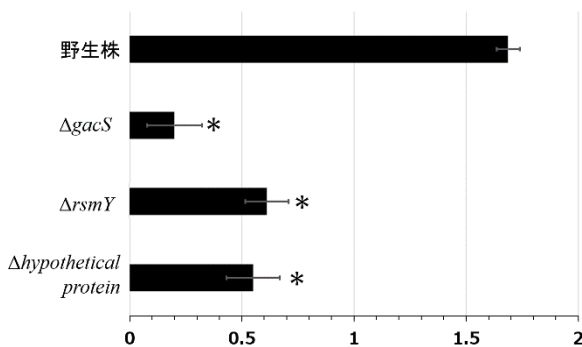


図.2 対峙培養によって形成された阻止円半径 (cm).
*は t 検定による有意差を示す ($p < 0.01$).

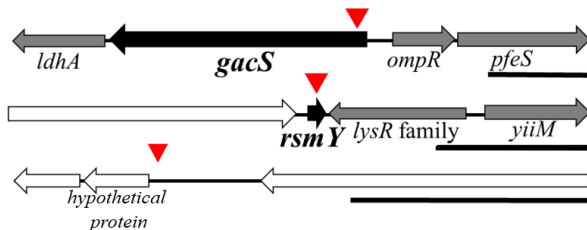


図.3 各遺伝子破壊株におけるトランスポゾン挿入位置. バーは 1kb を示す.

一般に多くの細菌ではアシルホモセリンラクトンなどの Auto Inducer を TCS が受容することで二次代謝の機能が活性化することが知られている. このことから, *Psc* 13985 が抗菌活性を示すためには二次代謝の活性化が重要であり, これには *GacS* を介して TCS が機能する必要があることが示唆された. また, 抗菌活性が低下した株の一つでは機能未知タンパク質の上流にトランスポゾンが挿入されていたが, このタンパク質はキナーゼと類似したモチーフを持っていることが分かった. 遺伝子破壊株の表現型が TCS 変異株と類似していることから,

シグナル伝達において何らかの働きを持つタンパク質である可能性が考えられた.

4. 今後の展望

本研究を通して, *Psc* 13985 が示す抗菌活性には *GacS* による TCS が起動して二次代謝が活性化することが必要であることが示唆された (図. 4). TCS の機能を人為的に調節できれば, より高い抗菌活性を *Psc* から引き出すことが可能になる. 今後は *Psc* の TCS を活性化するシグナル物質の探索や, 実際に抗菌活性に重要な役割を果たす二次代謝産物を特定することで, 植物病原性真菌に対する新たな防除方法に繋げていきたい.

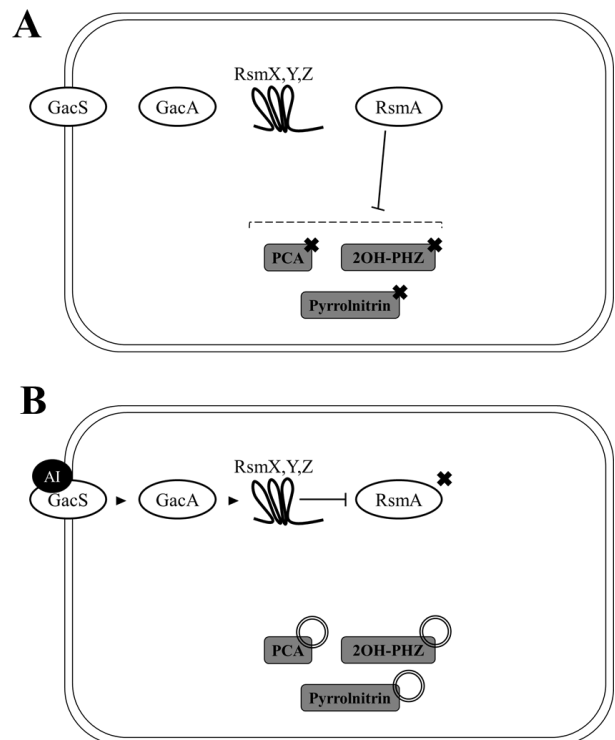


図.4 予想される本細菌の代謝メカニズム.
一次代謝を主にしている間は抗菌活性を示さない (A) が, TCS が活性を持つと抗菌活性を示すようになる (B).

5. 謝辞

本研究を行うにあたり, 様々なご指導を頂きました法政大学生命科学部応用植物科学科, 同大学院生命機能学専攻植物医科学領域の皆様へ, 心より御礼申し上げます.

参考文献

- 1) 染谷信孝, 諸星知広: *Pseudomonas chlororaphis* 色づく植物保護細菌, 土と微生物 Vol.73, pp.24-33, 2019
- 2) Dieter Haas, Geneviève Défago: Biological Control of Soil-Borne Pathogens By Fluorescent Pseudomonads, Nature Reviews Microbiology, Vol.3, pp.307-319, 2005